

TRIQUINELOSIS (INFECCIÓN POR *TRICHINELLA* SPP.)

RESUMEN

La triquinelosis del hombre está causada por el consumo de carne cruda o poco cocida de animales domésticos o de caza infectados por Trichinella. Los animales resultan infectados por ingerir músculos infectados por Trichinella. Las larvas infectivas ingeridas maduran y se reproducen en el intestino delgado de la especie hospedadora, incluyendo al hombre, los cerdos, las ratas, los osos, las morsas, ocasionalmente los caballos y cualquier otro mamífero carnívoro, y las aves y los reptiles. Los gusanos adultos sobreviven menos de 1 mes. Las larvas producidas migran hasta los músculos de sus hospedadores y persisten en ellos, sirviendo de fuente de infección para los nuevos hospedadores susceptibles.

Detección del agente: *Las pruebas de diagnóstico para la detección de Trichinella spp. se agrupan en dos categorías: 1) la detección directa de la primera etapa de la larva enquistada o libre en tejido de músculo estriado, y 2) la detección indirecta de la infección mediante pruebas para anticuerpos específicos.*

Para detectar directamente la infección por Trichinella en los tejidos, se utilizan el método de compresión y el método de digestión del tejido muscular. Las larvas de Trichinella normalmente se localizan en mayores concentraciones en los músculos preferidos, que varían según la especie hospedadora. Es importante muestrear dichos músculos preferidos para maximizar la sensibilidad. Por ejemplo, en los cerdos, los músculos del diafragma y la lengua son los dos preferidos, mientras que, en los caballos, los músculos de la lengua suelen hospedar la mayoría de los parásitos, seguidos por el masetero, el diafragma y los músculos del cuello.

Los métodos de digestión artificial incluyen la digestión enzimática de muestras de tejido muscular individuales o agrupadas, y utilizan la homogeneización o trituración mecánica, la agitación y la incubación. A continuación se aplican los procedimientos de filtración y sedimentación para recuperar y concentrar todas las larvas que se hayan liberado del músculo durante la digestión. Las muestras procesadas con estos métodos se someten a un examen estereomicroscópico para comprobar la presencia de larvas. Mediante los métodos de digestión se puede detectar < 1 larva por gramo (lpg) de tejido, pero estos bajos niveles de infección, la cantidad de músculo digerido y la desigual distribución de las larvas dentro de los tejidos (así como la escasa digestibilidad de ciertos tejidos y de las muestras de fauna salvaje que han sido congeladas o que se han estropeado por otros motivos) constituyen factores limitantes. Este inconveniente se compensa mediante el análisis de muestras más amplias de las canales, tales como un mínimo de 3–5 g en el caso de los cerdos y 5–10 g en el caso de los caballos, animales de caza y especies salvajes indicadoras, como los zorros. Estos métodos se recomiendan en la inspección individual de las canales de los animales de abasto, como los cerdos, los caballos y los animales de caza.

El método de compresión (triquinoscopia) es menos sensible que la digestión artificial y no es recomendable como prueba fiable para la inspección de las canales, ni en cuanto a inocuidad alimentaria ni en cuanto a vigilancia de las infecciones.

Pruebas serológicas: *Las pruebas serológicas son las que con mayor frecuencia se utilizan para la detección indirecta. La sensibilidad y la especificidad de los métodos serológicos dependen sobre todo del tipo y de la calidad del antígeno utilizado. La mayoría de los datos relativos a la realización (validación) de las pruebas serológicas provienen de su aplicación a los cerdos. Se pueden producir falsos negativos de tipo serológico hasta 1 semana o más después de que las larvas de los músculos se hagan infectivas en cerdos con una infección leve o moderada. También*

se han descrito falsos positivos en las pruebas serológicas. Para el seguimiento o verificación de rebaños libres de *Trichinella*, son aceptables pruebas serológicas, mientras que para efectuar una inspección individual de la canal, solo pueden recomendarse los métodos directos. En los cerdos se han detectado niveles de 1 larva/100 g de tejido mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA). Los antígenos secretores que se han recogido manteniendo in vitro durante un corto periodo de tiempo (18 horas) las larvas de *T. spiralis* del músculo constituyen actualmente la fuente más específica. Es de suma importancia la utilización de sueros control positivo y negativo adecuados para asegurarse de que los ELISA se realicen con un grado de sensibilidad y especificidad mínimamente aceptable. Se recomienda la digestión de 100 g o más de tejido como prueba confirmativa para los animales serológicamente positivos.

Requisitos para las vacunas: No existen vacunas adecuadas para la infección por *Trichinella* en los animales de abasto.

A. INTRODUCCIÓN

En los animales, los signos clínicos de las infecciones por *Trichinella* en general no se detectan, y es una enfermedad principalmente importante como zoonosis. La triquinosis del hombre está causada por la ingestión de carne cruda o poco cocida de animales de abasto o de caza (Gajadhar *et al.*, 2006). Los parásitos adultos, de breve vida, residen en el intestino delgado de las especies hospedadoras, incluyendo al hombre, los cerdos, las ratas, los osos, las morsas, los caballos, muchos otros mamíferos carnívoros, y algunas aves y reptiles. El parásito tiene un ciclo de vida directo. A las pocas horas de la ingestión del músculo infectado por un hospedador adecuado, las primeras larvas del músculo son liberadas por la digestión y comienzan a excavar túneles en las vellosidades del intestino delgado. Se convierten rápidamente en adultas (hay machos que alcanzan hasta 1,8 mm de longitud y hembras que llegan a los 3,7 mm) y sobreviven menos de 1 mes. Durante ese tiempo tiene lugar la cópula y las hembras, ovo-vivíparas, liberan las larvas recién nacidas (LRN), que migran por las vénulas y el sistema linfático hacia el sistema circulatorio general. Las LRN, por lo tanto, se diseminan por el cuerpo, invadiendo las células de músculo estriado y mostrando predilección por grupos específicos de músculos. Así, por ejemplo, en los cerdos, el pilar del diafragma y la lengua contienen la mayor concentración de larvas, seguida por el masetero, y en los caballos, la mayor concentración se da en la lengua y en segundo lugar en los músculos maseteros, del diafragma y del cuello. Los sitios preferidos varían de una especie hospedadora a otra, pero, en general, la lengua, los músculos maseteros y el diafragma son los lugares óptimos para la toma de muestras. Actualmente se dispone de información sobre la localización preferida en varias especies de hospedadores (Nockler *et al.*, 2000). En los casos de infección grave, la mayor parte de los músculos voluntarios contienen cantidades elevadas de larvas. Las larvas de casi todas las especies de *Trichinella* se envuelven en colágeno dentro de la musculatura del hospedador, donde permanecen infectivas durante años.

Dentro del género *Trichinella*, se han identificado doce taxones, a ocho de los cuales se les ha asignado la categoría de especie (Korhonen *et al.*, 2016; Pozio & Zarlenga, 2013). Los taxones de este género están divididos en dos grupos (clados); uno está caracterizado por larvas que se encapsulan solo en los músculos de mamíferos, y el otro por larvas que no se encapsulan en los músculos sino que infectan tanto hospedadores mamíferos como aviares o bien hospedadores tanto mamíferos como reptiles. Los taxones que encapsulan son los siguientes: *Trichinella spiralis* (T-1), originario de Asia oriental, actualmente se encuentra en zonas templadas de todo el mundo debido a su introducción pasiva y se asocia con frecuencia a los cerdos domésticos. Es muy infecciosa para los cerdos domésticos y los salvajes, ratones y ratas, pero también se ha detectado en otros mamíferos carnívoros y en caballos. *Trichinella nativa* (T-2) se presenta en los mamíferos carnívoros del ártico y de las regiones árticas de Norteamérica, Europa y Asia. Es muy resistente a la congelación, no se ha hallado ni en cerdos ni en caballos, y se ha comprobado experimentalmente que tiene poca infectividad en estas especies hospedadoras a pesar de que a veces se ha encontrado en jabalíes de regiones subárticas. *Trichinella britovi* (T-3) se encuentra principalmente en mamíferos salvajes y en cerdos, y ocasionalmente en los caballos, y se da en regiones templadas de Europa y Asia occidental y en el norte y occidente de África. *Trichinella murrelli* (T-5) se encuentra en los mamíferos carnívoros de Norteamérica. Tiene una infectividad baja en los cerdos domésticos, y se ha documentado en caballos. *Trichinella* T-6 está adaptada a los climas fríos, está estrechamente asociada a *T. nativa* en el norte de Norteamérica y también es muy resistente a la congelación (Pozio & Zarlenga, 2013). *Trichinella nelsoni* (T-7) se ha aislado de mamíferos carnívoros y, de forma esporádica, de cerdos salvajes en el África oriental y del sur. Se ha detectado *Trichinella* T-8 en mamíferos carnívoros de Namibia y Sudáfrica, y *Trichinella* T-9 en mamíferos carnívoros de Japón (Pozio & Zarlenga, 2013). T-8 y T-9 tienen en común rasgos intermedios entre *T. britovi* y *T. murrelli*, respectivamente. *Trichinella patagoniensis* (T-12) se ha aislado de leones de montaña de Argentina, y se ha comprobado experimentalmente que tiene poca infectividad en cerdos y roedores (Krivokapich *et al.*, 2012). Los taxones que no se encapsulan son los siguientes: *Trichinella pseudospiralis* (T-4) tiene una distribución cosmopolita y se ha aislado de aves rapaces, carnívoros y omnívoros salvajes, incluidos jabalíes domésticos y salvajes, y ratas y marsupiales de Asia, Norteamérica, Europa y Australia (Pozio, 2016a); Se ha informado sobre la presencia de *Trichinella papuae* (T-10) en cerdos domésticos y salvajes y en cocodrilos de granja en Papúa Nueva Guinea, Tailandia y Australia. Se ha descrito *Trichinella*

zimbabwensis (T-11) en cocodrilos salvajes y de granja en Zimbabwe, Sudáfrica, Etiopía y Mozambique, y en el lagarto monitor de Zimbabwe y en mamíferos carnívoros de Sudáfrica. Según los experimentos realizados, muestra una gran infectividad en una gran variedad de hospedadores mamíferos, incluidos los cerdos y las ratas (Poizio & Zarlenga, 2013). La mayoría de las especies y los genotipos de *Trichinella* se han detectado en humanos, y en general se acepta que todos los taxones de *Trichinella* son muy infectivos en las personas, lo cual supone un riesgo considerable para la salud pública. El riesgo de causar infección por *Trichinella* en piaras lo comportan principalmente *T. Spiralis* y, en menor grado, *T. britovi*, *T. Nelsoni*, *T. pseudospiralis*, *T. Papuae* y *T. zimbabwensis*, mientras que no hay indicios de que otras especies ni genotipos puedan desempeñar este papel.

La triquinosis en los humanos puede ser una enfermedad debilitadora que puede ocasionar la muerte. Los parásitos adultos, de vida corta, en el intestino delgado pueden causar gastroenteritis temporal, pero las señales y signos más graves se producen como resultado de la migración y establecimiento de las larvas en los músculos voluntarios. La enfermedad se transmite principalmente por la ingesta de carne de cerdo o presa infectada que no haya sido suficientemente cocida (o tratada con cualquier procedimiento que la haga inocua). Aunque la prevalencia de la infección por *Trichinella* en caballos es baja, el consumo de carne de caballo cruda o poco cocida es una fuente conocida de triquinosis en el ser humano (Boireau *et al.*, 2000). Para prevenir la infección en el hombre es necesario inspeccionar la carne procesándola adecuadamente (bien sea cocándola, congelándola o curándola) y evitando el contacto de los animales destinados al consumo humano con carne que contenga larvas de *Trichinella*, incluyendo los desperdicios de la comida sin cocer, con roedores y con otros animales salvajes (Gajadhar *et al.*, 2006; Gamble, 1997; Gamble *et al.*, 2000). La carne procedente de la caza siempre debe considerarse una posible fuente de infección y, por tanto, dicha carne debe ser controlada o cocida cuidadosamente. La *Trichinella* que se encuentra en la carne procedente de la caza (principalmente *T. nativa*, T-6 y, en menor grado, *T. britovi*) puede ser resistente a la congelación y, por lo tanto, la carne de animales de caza congelada que no se haya sometido a análisis puede también suponer un riesgo para la salud pública (Poizio, 2016b). Los parásitos del género *Trichinella* circulan básicamente en animales salvajes y, en cuanto a los animales domésticos, suelen infectar solo a cerdos asilvestrados o de traspasado (Poizio, 2014), y en ocasiones muy infrecuentes, a los caballos; la carne de caballo o de caza infectada por *Trichinella* se ha relacionado con brotes vinculados al comercio internacional (Poizio, 2015). La importación ilegal de carne de cerdo o jabalí en el equipaje personal ha originado muchos brotes de triquinosis (Poizio, 2015).

Los métodos analíticos para la detección de la infección por *Trichinella* en los cerdos y otras especies o bien sirven (a) para detectar directamente el parásito en las muestras de tejido o (b) para demostrar de forma indirecta la presencia del parásito detectando anticuerpos específicos frente a *Trichinella* spp. en muestras de sangre, suero o líquido tisular (Gajadhar *et al.*, 2009).

La manipulación de laboratorio debe realizarse con procedimientos de bioseguridad y contención adecuados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones para los animales*). El riesgo de que los operarios adquieran infección en el laboratorio es muy bajo si se siguen unas buenas prácticas de laboratorio. La infección se contrae mediante la ingesta de larvas musculares en los tejidos o liberadas mediante digestión artificial. Las larvas desnudas mueren rápidamente cuando son expuestas al medio o a desinfectantes comunes. El material de vidrio u otras superficies contaminadas pueden limpiarse con agua a $\geq 85^{\circ}\text{C}$ para lisa y eliminar todas las larvas. Los residuos de laboratorio, incluidos restos de muestras, deben tratarse hirviéndolos, esterilizándolos en autoclave, incinerándolos o sometiéndolos a otros procesos que permitan matar las larvas y prevenir la re-introducción en el medio. Esto es especialmente importante cuando se analizan muestras que contengan larvas vivas en una zona no endémica.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para la detección de infecciones por *Trichinella* en cerdos y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos positivos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del parásito	–n/a	–n/a	–n/a	+++	+++	n/a
Detección de antígeno	–n/a	–n/a	–n/a	–n/a	–n/a	n/a
PCR múltiple	–n/a	–n/a	–n/a	+++	+	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+	+	–n/a	+	n/a
Inmuno-electro-transferencia	++	+	+	–n/a	+	n/a

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimo-inmunoanálisis.

1. Identificación del agente

Los únicos procedimientos recomendados para la detección de las larvas de *Trichinella* en la carne son las pruebas de digestión enzimática. En varios países se reconoce oficialmente un cierto número de pruebas de digestión con fines comerciales. La Comisión Internacional para Triquinosis (CIT, <http://www.trichinellosis.org/>) recomienda varias de estas pruebas, que constituyen estándares documentados en la UE, Canadá y otros lugares (*Canadian Food Inspection Agency*, 2010; Comisión Europea, 2015). Otros métodos oficiales no se recomiendan debido a su nula eficacia o fiabilidad. Las pruebas de diagnóstico modernas deben cumplir con las normas internacionales sobre garantía de calidad, que incluyen datos de validación con una base científica y un diseño que permita el control sistemático y la documentación de los principales puntos de control. Recientemente, se ha publicado la norma ISO 18743:2015 relativa a la detección de larvas de *Trichinella* en animales. La prueba de la digestión aquí recomendada se basa en las interesantes innovaciones inherentes a algunas pruebas de digestión que se han adoptado para el comercio internacional.

1.1. Procedimiento directo recomendado para analizar tejido muscular

1.1.1. Sensibilidad

La sensibilidad de los métodos analíticos directos depende de la cantidad de tejido examinado y del lugar del que se haya obtenido la muestra. Los métodos directos permitirán la identificación de cerdos, caballos u otros animales infectados por *Trichinella* sp. en un plazo mínimo de 17 días después de la exposición al parásito, intervalo que coincide con el tiempo necesario para que las larvas alojadas en los músculos adquieran la capacidad de infectar a un nuevo hospedador. En muestras frescas, los métodos directos son más sensibles. El número de larvas que pueden recuperarse de las muestras disminuye de forma impredecible tras un largo conservación, la putrefacción y la congelación. Las muestras para pruebas de inocuidad alimentaria deben conservarse a 4°C y analizarse cuanto antes, y por descontado antes de que

¹ Se recomienda aplicar varios métodos de identificación a una misma muestra clínica.

se pudran. En el caso de las muestras más grandes de fauna salvaje (≥ 10 g), deben analizarse para compensar un posible descenso de la sensibilidad debido a una posible variación de los puntos de elección en estas especies hospedadoras, así como a unas condiciones de conservación más variables. Los métodos actuales para analizar la inocuidad alimentaria en muestras frescas o para la inspección de animales determinados mediante digestión artificial y mediante el empleo de una muestra de 1 g tienen una sensibilidad de aproximadamente tres larvas/g de tejido, y el análisis de una muestra de 5 g aumenta la sensibilidad a 1 larva por g (lpg) de tejido (Gamble *et al.*, 2000; Nockler *et al.*, 2000). La sensibilidad de esta prueba aumenta considerablemente cuando se dispone de grandes cantidades de tejido (hasta 100 g) para la digestión.

1.1.2. Obtención de muestras

Las pruebas se realizan normalmente en muestras de las canales recogidas post mórtem. Las muestras de los músculos se toman de los sitios predilectos, normalmente de los pilares del diafragma o de la lengua en el caso de los cerdos, o de la lengua o los músculos maseteros en el caso de los caballos. En el caso de la fauna salvaje en la que se desconocen cuáles son los mejores puntos de muestreo, pueden tomarse muestras de la lengua (de elección), el diafragma o el masetero. El músculo tibial anterior es el lugar de elección en el caso de los zorros. Los tamaños de muestra para la inspección de la canal se basan en la detección fiable de animales que albergan ≥ 1 lpg en tejido, pero a efectos de la vigilancia, se precisa una mayor sensibilidad para aportar datos sobre la prevalencia de la infección más exactos y para superar las limitaciones del muestreo, como las que se producen en el caso de la fauna salvaje. Las muestras para la vigilancia deben pesar ≥ 10 g y obtenerse de puntos de elección (si se sabe cuáles son). Muestras de 100 g permitirían la detección de 0,01 lpg en el tejido de origen, y si la muestra se obtuviera de un punto de elección, un resultado bajo o negativo indicaría una carga larvaria insignificante en el resto de la canal, con un bajo riesgo asociado de transmisión. En el caso de los análisis de inocuidad alimentaria o de inspección de la canal, cada prueba de digestión permite analizar hasta 100 g de tejido muscular. Se pueden tomar muestras individuales de 100 g de un único animal, o se pueden tomar varias muestras de menor tamaño de varios animales para obtener una muestra combinada de 100 g. El tamaño de las muestras que componen esta muestra combinada determinará la sensibilidad del método por cada muestra. La CIT recomienda muestras de 5 g por cerdo para las pruebas que se realizan en zonas endémicas (Gamble *et al.*, 2000). Para analizar la carne de caballo, se requiere un mínimo de 5 g por canal. En el caso de los caballos procedentes de zonas endémicas, o si se consume carne de caballo cruda, se recomienda utilizar una muestra de 10 g (Gamble *et al.*, 2000). Analizar estas cantidades de músculo debería prevenir la triquinosis en el ser humano, pero no permite prevenir las infecciones asintomáticas derivadas del consumo de carne infectada con cantidades muy bajas de larvas.

1.1.3. Pruebas confirmativas de muestras digeridas en grupo y para animales serológicamente positivos

Cuando se digiere una combinación de muestras de distintos animales y arroja un resultado positivo, deben emplearse pruebas de digestión adicionales para volver a analizar conjuntos de muestras de un número cada vez menor de animales, hasta llegar a analizar un solo animal con el fin de determinar la identidad del animal(es) infectados. En el caso de los animales que dan positivo en pruebas serológicas, deben analizarse los tejidos mediante digestión para confirmar el estado de infección y para facilitar la recuperación de larvas y la identificación de la especie.

1.1.4. Digestión y detección

- i) Se determina el volumen de la solución de digestión requerida para la digestión (2.000 ml de la solución para 100 g de carne y 1.000 ml para 50 g o menos).
- ii) Solución de digestión: Se prepara un volumen apropiado de una solución de HCl/agua añadiendo el HCl a agua del grifo (p.ej., para 20 litros se emplean 11 ml de HCl al 37% o 16 ml de HCl al 25%) y no al revés. No se añade pepsina a la solución en ese momento. Se debe precalentar esa solución a 45°C antes de su uso. (Ahora se vende un kit de análisis para la digestión de *Trichinella* que funciona con proteasa de serina en el que no se emplean reactivos peligrosos y que sirve de alternativa a la prueba de la pepsina/HCl; la UE solo lo ha autorizado para el análisis de cerdos [se puede solicitar más información al Laboratorio de Referencia de la OIE, en Roma, Italia]).
- iii) Se retira tanta grasa y fascia como sea posible de cada muestra de carne.

- iv) Se pesa la cantidad adecuada de carne magra de cada muestra. Se corta cada muestra en trocitos de 1–2 g y se mezclan con otras muestras hasta lograr una cantidad de 100 g.
- v) Se coloca la muestra de carne agrupada en un triturador. Se añaden 50–100 ml de la solución de agua/HCl para la mezcla de una muestra de 100 g.
- vi) Se pica la carne en el triturador hasta que esté homogeneizada (no deben quedar trocitos enteros de carne; la muestra debe tener la consistencia de un puré para bebés). Esto se logra normalmente con varias pulsaciones de 1–3 segundos. Se añaden aproximadamente 100 ml de la solución preparada de agua/HCl y se mezcla hasta que la mezcla tenga una textura líquida uniforme. Eso puede requerir 5–10 segundos (es posible que sea necesario añadir más solución).
- vii) Se esparcen 10 g de pepsina (1:10.000 NF/1:12.500 BP/2.000 FIP; granular o una cantidad equivalente de pepsina líquida) sobre el homogenado, se añaden unos 200 ml de solución de agua/HCl, y se mezcla durante unos 5 segundos.
- viii) Se transfiere la muestra homogeneizada a una cubeta de 3 litros que contenga un agitador. Se añade el resto de los 2 litros de solución de agua/HCl vertiéndolos en el triturador y se aclara todo el homogenado residual introduciéndolo en la cubeta de 3 litros. Se aclara el posible material adherido a la tapa del triturador y se vierte el agua con los restos del aclarado en la cubeta utilizando 10–20 ml de solución digestiva mediante un frasco con eyector.
- ix) Se coloca la cubeta en la plancha precalentada de un agitador magnético o en una cámara de incubación ajustada a $45\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se cubre la cubeta con papel de aluminio. Se activa el agitador a una velocidad lo bastante alta como para crear un vórtex potente que no salpique. Nota: Si la temperatura de digestión al comienzo de la digestión es inferior a $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, debe dejarse que la muestra se caliente a esa temperatura antes de iniciar el cronometraje de la digestión.
- x) Se deja que continúe la digestión durante 30 minutos. Si la temperatura de digestión desciende por debajo de $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, puede que sea necesario más tiempo para que termine la digestión. Esto se puede decidir previa observación de la mezcla de la digestión. Si se observan trozos de tejido muscular, no digeridos, la digestión debe prolongarse otros 30 minutos o hasta que esos trozos se digieran. Hay que asegurarse de no sobrepasar la temperatura de digestión. Como alternativa, puede realizarse la digestión a 37°C durante un mayor periodo de tiempo.
- xi) Como máximo 5 minutos después de retirar el líquido de digestión de la plancha del agitador magnético o de la cámara de incubación, se vierte aquel, a través de un filtro de malla de 177–180 μm , en un embudo de separación de dos litros o mayor con una relación altura:anchura de alrededor de 2:1. Se aclara la cubeta con suficiente agua del grifo a temperatura ambiente utilizando un frasco con eyector y se introducen los restos aclarados en un embudo de separación de 2 litros a través del tamiz.
- xii) Se aclara el tamiz sobre el embudo de separación de 2 litros, con un chorro de agua del grifo a temperatura ambiente vertido sobre el tamiz. No deberían quedar trozos de músculo no digeridos sobre el tamiz, aunque pueden quedar restos de grasa, fascia y otros tejidos que también deben aclararse para eliminar todas las posibles larvas adheridas al embudo. Se deja que el líquido del embudo de separación se sedimente durante 30 minutos.
- xiii) Se escurren 40 ml del líquido de la digestión del embudo separador en un tubo cónico o en un cilindro medidor (frasco Pilsner) de 50 ml y se deja durante 10 minutos.
- xiv) Transcurridos los 10 minutos, se usa una pipeta para retirar 30 ml de la parte superior del líquido (o sobrenadante), dejando en el tubo los 10 ml del fondo (no se deben derramar los 30 ml del sobrenadante, ya que eso puede remover el sedimento).
- xv) Se remueven con suavidad los 10 ml de líquido restantes y se transfieren rápidamente a una placa de Petri con una rejilla o a una bandeja para recuento de larvas. Se aclara el tubo o cilindro sobre una placa de Petri dos veces usando 5 ml de agua del grifo cada vez. La capa líquida de la placa de Petri debe tener una profundidad de solo unos pocos milímetros.
- xvi) Ha de esperarse un mínimo de 1 minuto para que las larvas se depositen en el fondo, luego se utiliza un estereomicroscopio a 10–16 aumentos a fin de examinar de forma sistemática cada rejilla de la placa de Petri para detectar la presencia de larvas de *Trichinella*. La detección de larvas sospechosas en ese examen sistemático debe confirmarse mediante la identificación de detalles morfológicos utilizando un aumento

mayor, por ejemplo de 40. Si el sedimento está turbio o es difícil de analizar, se procederá a una clarificación adicional como se describe más adelante.

- xvii) Los productos de la digestión deben analizarse tan pronto como estén listos. En ningún caso debe posponerse el análisis de los productos digeridos para el día siguiente.
- xviii) Si los productos de la digestión no se examinan antes de que transcurran 30 minutos después de su preparación, o bien están demasiado turbios como para poder examinarlos con precisión, es posible que haya que clarificarlos como se describe más adelante.
- xix) Clarificación de la muestra: se transfiere el contenido de la placa de Petri a un tubo cónico de 50 ml utilizando una pipeta. Se aclara la placa de Petri con agua del grifo, añadiendo el agua del aclarado al tubo cónico. Se añade más agua hasta completar un volumen de 45 ml. Se deja que el tubo se sedimente, sin remover, durante 10 minutos.

Después de los 10 minutos se utiliza una pipeta para retirar el sobrenadante, dejando los 10 ml del fondo (no se debe derramar el sobrenadante, ya que eso podría alterar el sedimento). Se guarda el líquido retirado para su eliminación o descontaminación una vez se haya leído la muestra.

Se repiten los pasos (xv) y (xvi).

- xx) En caso de un resultado positivo o dudoso, debe tomarse una muestra adicional de cada canal para completar la muestra agrupada. Esas muestras deben analizarse individualmente o en grupos sucesivos más pequeños hasta que se puedan identificar los animales infectados.

1.1.5. Identificación de las larvas

Una vez separadas por digestión de la célula muscular, las larvas de la primera fase del ciclo miden aproximadamente 1 mm de largo y 0,03 mm de ancho. El rasgo más característico de las larvas de *Trichinella* es el esticosoma, formado por una serie de células discoides que, dispuestas a lo largo del esófago, ocupan la mitad anterior del cuerpo del parásito. Las larvas de *Trichinella* pueden aparecer enroscadas (a baja temperatura), móviles (a temperatura templada) o en forma de una C (media luna) (cuando están muertas). En caso de duda, las larvas deben observarse con un mayor aumento y deben digerirse más tejidos. Si el número de larvas es elevado, deberá repetirse la prueba llevando antes la muestra a una dilución apropiada para obtener recuentos exactos.

Las larvas recuperadas mediante la digestión del músculo pueden conservarse en etanol al 90–95% o al 70-75% (o al 95% si es una conservación larga) para la posterior genotipificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase el apartado B.1.3).

1.1.6. Garantía de calidad

Los laboratorios que utilicen métodos de digestión artificial deben mantener un sistema de garantía de calidad apropiado para garantizar la sensibilidad de la prueba. Los componentes de un sistema de garantía de calidad para la prueba de digestión están descritos por la CIT (<http://www.trichinellosis.org/>) y en otros lugares (Gajadhar & Forbes, 2001; Gajadhar *et al.*, 2009), y deben incluir el uso regular de pruebas de suficiencia (Forbes *et al.*, 1998; 2005; Gajadhar *et al.*, 2009).

1.2. Otros métodos de detección directa

1.2.1. El método del embudo de separación doble

Esta prueba se recomienda como alternativa al procedimiento de digestión común descrito anteriormente, y está autorizada por la UE para su empleo con fines de exportación. Este método se diseñó para su aplicación en condiciones estrictas de control de calidad, para minimizar los errores técnicos, y se ha validado ampliamente para su utilización en la carne de cerdo y de caballo (Forbes & Gajadhar, 1999; Forbes *et al.*, 2008). Incluye una técnica de digestión con un spin-bar y embudos de separación secuencial para la sedimentación de las larvas. El procedimiento tiene pocas fases, requiere menos tiempo y apenas necesita fases de clarificación adicionales. Para realizar la digestión se utiliza una cámara de incubación equipada con puertas de cristal transparente y con una temperatura de 45°C. La digestión se realiza en 3 litros de líquido de digestión en un agitador magnético. Tras la digestión, se cuele

la suspensión en un embudo de separación de 4 litros a través de una malla de filtro de 177–180 µm, que se aclara meticulosamente con agua del grifo hacia el interior del embudo de separación. Se deja que la suspensión se sedimente durante 30 minutos y se escurren 125 ml en un embudo de separación de 500 ml. Se aumenta el volumen hasta 500 ml añadiendo 375 ml de agua del grifo, y se deja que la suspensión resultante se sedimente durante 10 minutos más. Finalmente, se escurren 22–27 ml de sedimento en una placa de Petri y se examina para comprobar la presencia larvas como se ha descrito anteriormente.

1.2.2. Método de digestión de una muestra combinada asistido mecánicamente/ técnica de sedimentación

En este método se emplea un triturador Stomacher para la fase de digestión y un embudo de separación para la sedimentación de las larvas (*Método A equivalente, Reglamento [CE] No. 2075/2005*) (Comisión Europea, 2005).

1.2.3. Método de digestión automática para muestras combinadas de hasta 35 g

Este método consiste en una cámara de digestión automática y un filtro de membrana para la recuperación y examen de larvas (*Método C equivalente, Reglamento [CE] No 2075/2005, Comisión Europea, 2005*). Los pasos críticos de la digestión y la recuperación de larvas son difíciles de controlar en el método automático, y ni la CIT ni la OIE lo recomiendan.

1.3. Otras pruebas

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Algunos estudios han puesto de manifiesto que se puede utilizar la PCR para detectar el ácido nucleico de las larvas de la musculatura de los animales infectados. Sin embargo, carece de sensibilidad y no es práctico para el uso sistemático en animales de abasto. La identificación de las especies o los genotipos de *Trichinella* recuperados del tejido muscular puede ser útil para entender la epidemiología de los parásitos en animales, para evaluar el riesgo relativo de la exposición humana y para rastrear la explotación en la que se haya originado la infección. Se han desarrollado cebadores específicos que permiten la identificación a nivel de especie y de genotipo de larvas determinadas, tomadas de tejidos musculares, mediante la PCR (Poizio & La Rosa, 2003). La CIT (<http://trichinellosis.org/>) ha elaborado directrices detalladas para la identificación de larvas de *Trichinella* en estadio muscular a nivel de especie o de genotipo. La solicitud para aislar o genotipificar las larvas de *Trichinella* puede hacerse a través del Laboratorio de Referencia de la OIE, en Roma, Italia, o en Saskatoon, Canadá (véase la tabla de la Parte 4 de este Manual Terrestre).

1.3.2. Triquinoscopia

Este método implica la compresión de múltiples trozos de tejido muscular de 2 × 10 mm entre dos placas de vidrio (*compressorium*) hasta que se vuelven translúcidos, seguida de un examen al microscopio. Se dispone de datos comparativos según los cuales la triquinoscopia no es tan sensible como las pruebas de digestión (Forbes *et al.*, 2003; Gajadhar *et al.*, 2009). **Ni la CIT, ni la UE ni la OIE recomiendan** la triquinoscopia como análisis sistemático de las canales (Comisión Europea, 2015/1375; <http://www.trichinellosis.org/>).

2. Pruebas serológicas

Se han descrito una serie de pruebas para el diagnóstico de las infecciones por *Trichinella* en los animales domésticos y salvajes (Gamble *et al.*, 2004). Los métodos incluyen las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFA), inmunotransferencia enzimática (IEBT), inmunoelectrotransferencia, pruebas de inmunohistoquímica enzimática, y el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). El ELISA y la inmunoelectrotransferencia se han validado de acuerdo con las normas de la OIE (Gómez Morales *et al.*, 2012; 2014; 2015; 2016). Se pueden solicitar sueros porcinos de referencia al Laboratorio de Referencia de la OIE, en Roma, Italia (Gómez Morales *et al.*, 2015). La CIT ha ofrecido un conjunto uniforme de recomendaciones para la elaboración y el uso de las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos en circulación (Gamble *et al.*, 2004). El ELISA es la única prueba avalada por la CIT. Está autorizado solamente como herramienta de vigilancia para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* en los cerdos; no es fiable para la detección de la infección por *Trichinella* en animales específicos con fines de seguridad alimentaria o de otro tipo.

Aunque otras pruebas serológicas pueden tener algunas aplicaciones prácticas, el ELISA es reconocido generalmente como el método de elección por ser económico, fiable y adaptable a las prácticas de garantía de calidad, aumentando la cantidad de datos de validación y potenciando la sensibilidad y la especificidad cuando

se aplica en condiciones adecuadas. Es un instrumento útil para llevar a cabo en poblaciones y se utiliza de forma sistemática para los programas de vigilancia y las investigaciones de los brotes de la enfermedad. Se recomienda realizar las muestras con un método de inmunoelectrotransferencia validado para confirmar todo resultado de ELISA que haya sido positivo (Gómez Morales *et al.*, 2012).

2.1. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

2.1.1. Sensibilidad y especificidad

En los cerdos se pueden detectar niveles de infección muy bajos (Gamble *et al.*, 2004), de una larva por 100 g de tejido, mediante ELISA. Este alto nivel de sensibilidad hace de la prueba serológica ELISA un método útil para la detección de la transmisión de la infección por *Trichinella* a nivel de exploración o para los programas de vigilancia más amplios. Una desventaja de la serología en la detección de infecciones por *Trichinella* es la incidencia de algunos falsos negativos que se han observado en el caso de los animales infectados y cierto número de falsos positivos, que puede ser bastante alto entre los cerdos y jabalíes de traspatio y asilvestrados. Los falsos negativos se deben principalmente a lo que tarda la respuesta inmunitaria tras la ingesta de larvas infectivas, mientras que los falsos positivos se deben a reacciones cruzadas con otros microorganismos. En los cerdos, normalmente no hay niveles detectables de anticuerpos hasta 3–5 semanas o más después de la exposición (Gamble, 1996; Gamble *et al.*, 1996). Por esta razón, las pruebas serológicas no son recomendables en las pruebas con canales individuales. Las respuestas serológicas persisten en los cerdos durante un largo período después de la infección sin disminución del título; sin embargo, se ha detectado la disminución de anticuerpos en los caballos a los pocos meses de la infección (Nockler *et al.*, 2000). Las pruebas serológicas pueden ser poco útiles en los caballos, ya que los títulos de anticuerpos terminan por descender por debajo de los niveles de diagnóstico a pesar de la presencia de larvas infectantes en los músculos (Hill *et al.*, 2007; Pozio *et al.*, 2002). Es poco lo que se conoce acerca de las respuestas de los anticuerpos a la infección por *Trichinella* en las especies de caza y otros animales salvajes, pero deben obtenerse muestras de suero de gran calidad con el fin de disminuir la probabilidad de falsos positivos. Existen datos para la validación de la serología relativos al cerdo doméstico, aunque para otras especies solo existe algo de información, como estudios sobre el ELISA y la inmunoelectrotransferencia en jabalíes y perros (Gómez Morales *et al.*, 2014; 2016).

2.1.2. Muestras

La utilización del ELISA para detectar la presencia de los anticuerpos específicos del parásito constituye un método que puede realizarse con suero, sangre entera, plasma o líquido de tejidos recogidos antes o después del sacrificio (Gamble & Patrascu, 1996). Las diluciones utilizadas son distintas en función de si se trabaja con suero o con líquido de tejidos, puesto que la concentración de anticuerpos es superior en el suero que en el líquido tisular (Nockler *et al.*, 2005).

2.1.3. Antígenos

La especificidad y sensibilidad del ELISA dependen en gran medida de los antígenos utilizados en la prueba. Los TSL-1 son los principales componentes de los antígenos excretor/secretor (ES) y los secretan específicamente los esticocitos de las larvas L1 vivas. Los TSL-1 cuentan con un epítipo carbohidrato inmunodominante común que es reconocido por todos los animales infectados por *Trichinella*. Los antígenos secretores (ES) de *T. spiralis* usados en el ELISA se conservan en todas las especies y genotipos de *Trichinella* (Ortega-Pierres *et al.*, 1996) aunque se hayan detectado ciertas diferencias, y, por tanto, la infección puede detectarse en cerdos o en otros animales que hospeden alguno de los doce taxones. Se han elaborado preparaciones de antígeno ES que proporcionan un alto grado de especificidad para detectar la infección por *Trichinella* en cerdos (Gamble *et al.*, 1988).

2.1.4. Producción de antígeno

El diagnóstico de la infección por *Trichinella* mediante el ELISA se puede realizar utilizando los productos ES de las larvas de *Trichinella* en cultivo (Gamble *et al.*, 1988). A efectos de estandarización, es recomendable que *T. spiralis* se utilice para la producción de antígeno para las pruebas con animales de abasto. Sin embargo, se ha demostrado que el antígeno preparado de cualquier otra especie de *Trichinella* puede usarse para la detección de anticuerpos en animales infectados independientemente de cuál sea la especie que produce la infección (Kapel & Gamble, 2000). Los parásitos que van a usarse en la preparación de antígeno deben ser mantenidos por pases seriados en ratones, ratas o cobayas.

Para preparar antígenos que se vayan a utilizar en los ELISA (Gamble *et al.*, 1988), se recuperan larvas de primer estadio de *T. spiralis* (T-1) de las canales de ratones de campo o de ratas sin piel ni vísceras mediante la digestión en pepsina al 1% con HCl al 1% a 37°C durante 30 minutos (como se ha descrito anteriormente). Se lavan las larvas (3 veces durante 20 minutos cada vez) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con penicilina (500 unidades/ml) y estreptomycin (500 unidades/ml). Luego se colocan (a una concentración de 5.000 L1/ml) en DMEM suplementado con HEPES (hidroxiethylpiperazina N-2, ácido etanesulfónico N-2) (10mM), glutamina (2mM), piruvato (1mM) y penicilina (250 unidades/ml) / estreptomycin (250 µg/ml) (DMEM completo) a 37°C en atmósfera con un 10% de CO₂. El medio de cultivo se recupera después de no más de 18 horas, se retiran los vermes mediante filtración y el fluido se concentra a presión mediante una membrana de retención de un peso molecular de 5.000 Da. Los antígenos (ES) así recuperados pueden conservarse congelados durante cortos períodos a -20°C o durante más tiempo a -70°C; estos antígenos contienen aproximadamente 25 componentes proteicos según SDS/PAGE (sulfato dodecil de sodio / electroforesis en gel de poliacrilamida), muchos de los cuales admiten la diagnosis del epitopo de antígeno de carbohidrato TSL-1.

La pureza del antígeno es fundamental para la especificidad del ELISA. Deben seguirse varios pasos para realizar el seguimiento del crecimiento de las bacterias, bien sea de forma visual con el microscopio o recubriendo una muestra de medio. Los cultivos que muestren crecimiento bacteriano, en cualquier grado, deben ser desechados. Las larvas no deben mantenerse más de 18 horas; el deterioro de las lombrices después de este tiempo contribuye al escape de antígenos somáticos que reducen la especificidad de la prueba. Los antígenos producidos de la forma descrita deben tener un ratio de absorbancia a 280:260 nm de >1,0. Antes de usarse, los antígenos obtenidos a partir del cultivo *in-vitro* de las larvas de *Trichinella* deben analizarse frente a un panel de sueros que se sepa que son positivos y negativos.

2.1.5. Procedimiento analítico

Más adelante se expone un ejemplo de un ELISA para detectar la infección por *Trichinella* en cerdos. Es esencial que todos los reactivos usados en esta prueba estén estandarizados respecto a una concentración óptima, con el fin de obtener resultados fiables. Los valores típicos se indican en el ejemplo.

- i) Se cubre la placa de microtitulación de 96 pocillos con 100 µl de antígenos ES de *T. spiralis* diluidos a 5 µg/ml en agua tamponada (carbonato/bicarbonato tamponado 50 mM, pH 9,6). Se realiza la cobertura durante 60 minutos a 37°C o toda la noche a 4°C.
- ii) Se lavan tres veces los pocillos cubiertos con antígeno en tampón de lavado que contenga Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, leche desnatada en polvo al 5% y Triton X-100 al 1,0%. Después de cada lavado, las placas se deben secar.
- iii) Se diluye a 1/50 o 1/100 suero de cerdo en tampón de lavado. Las fuentes alternativas de anticuerpos que pueden usarse en lugar de los sueros son, entre otros, la sangre total o los líquidos de tejidos a una dilución de 1/5 o 1/10 (Nockler *et al.*, 2005). Se agregan 100 µl de suero diluido a los pocillos cubiertos con antígeno. Debe usarse en cada placa una muestra de suero positivo conocida y una muestra de suero negativo conocida con una dilución idéntica a la de los sueros problema. Se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- iv) Se lavan tres veces los pocillos como en el apartado ii.
- v) Se añade a cada pocillo 100 microlitros de un anticuerpo anti-IgG porcina obtenido en conejo, purificado por afinidad y conjugado con peroxidasa a una dilución apropiada en tampón de lavado. Tras añadir el segundo anticuerpo, se incuban las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- vi) Se lavan tres veces los pocillos como en el apartado (ii) y se enjuagan una vez con agua destilada.
- vii) Se añaden 100 µl de un sustrato de peroxidasa apropiado (por ejemplo, ácido aminosalicílico-5' [0,8 mg/ml] con hidrógeno de peróxido al 0,005%, pH 5,6-6,0).
- viii) Después de 5-15 minutos, se leen las placas para ver la densidad del color a 450 nm en un lector de microtitulación automático. Los valores obtenidos en los ELISA superiores al valor umbral se considerarán positivos (Jacobson, 1998).

Existen adaptaciones comerciales del ELISA. El fabricante debe validar el equipo antes de la concesión de la licencia y el usuario también debe evaluar el funcionamiento del equipo antes de su uso mediante la utilización de muestras de referencia positivas y negativas.

La prueba debe aplicarse en un ambiente en el que se cumplan las normas de gestión de calidad aceptadas internacionalmente, como la ISO 17025.

Existen sueros porcinos de referencia estándar que pueden solicitarse al Laboratorio de Referencia de la OIE, en Roma, Italia (Gómez Morales *et al.*, 2015). Además de emplear sueros de referencia estándar, deben evaluarse los ELISA comerciales e internos contra un banco de sueros control negativos que represente la población analizada, y un grupo de animales positivos que represente distintas fases de la infección, según indican las directrices de la CIT.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No existen vacunas frente a las infecciones por *Trichinella* en los animales de abasto ni en los de caza.

BIBLIOGRAFÍA

BOIREAU P., VALLEE I., ROMAN T., PERRET C., MINGYUAN L., GAMBLE H.R. & GAJADHAR A. (2000). *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Vet. Parasitol.*, **93**, 309–320.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY (2010). Meat Hygiene Manual of Procedures, Chapter 5, Sampling and Testing, Section 5.5.2.7.6, Double Separatory Funnel.

EUROPEAN COMMISSION (2005). Commission Regulation (EC) No. 2075/2005 of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Off. J. European Union*, L**338**, 60–82 (Regulation as last amended by Commission Regulation (EC) No 1245/2007: *Off. J. European Union*, L **281**, 19–20).

EUROPEAN COMMISSION (2015). Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Off. J. European Union*, L**212/7**, 11.8.2015, 7–34

FORBES L.B., HILL D.E., PARKER S., TESSARO S.V., GAMBLE H.R. & GAJADHAR A.A. (2008). Complete validation of a unique digestion assay to detect *Trichinella* larvae in horse meat demonstrates its reliability for meeting food safety and trade requirements. *J. Food Prot.*, **71**, 558–563.

FORBES L.B. & GAJADHAR A.A. (1999). A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food Prot.*, **62**, 1308–1313.

FORBES L.B., PARKER S., & SCANDRETT W.B. (2003). Comparison of a modified digestion assay with trichinoscopy for the detection of *Trichinella* larvae in pork. *J. Food Prot.*, **66**, 1043–1046.

FORBES L.B., RAJIC A. & GAJADHAR A.A. (1998). Proficiency samples for quality assurance in *Trichinella* digestion tests. *J. Food Prot.*, **61**, 1396–1399.

FORBES L.B., SCANDRETT W.B. & GAJADHAR A.A. (2005). A program to accredit laboratories for reliable testing of pork and horsemeat for *Trichinella*. *Vet. Parasitol.*, **132**, 173–177.

GAJADHAR A.A. & FORBES L.B. (2001). An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety with example data on trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, **103**, 133–140.

GAJADHAR A.A., POZIO E., GAMBLE H.R., NOCKLER K., MADDOX-HYTTEL C., FORBES L.B., VALLEE I., ROSSI P., MARINCULIC A. & BOIREAU P. (2009). *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet. Parasitol.*, **159**, 197–205.

GAJADHAR A.A., SCANDRETT W.B. & FORBES L.B. (2006). Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25** (2), 595–606.

GAMBLE H.R. (1996). Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Prot.*, **59**, 295–298.

GAMBLE H.R. (1997). Parasites associated with pork and pork products. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **16**, 496–506.

GAMBLE H.R., BESSONOV A.S., CUPERLOVIC K., GAJADHAR A.A., VAN KNAPEN F., NOECKLER K., SCHENONE H. & ZHU X. (2000). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.*, **93**, 393–408.

- GAMBLE H.R., GAJADHAR A.A. & SOLOMON M.B. (1996). Methods for the detection of trichinellosis in horses. *J. Food Prot.*, **59**, 420–425.
- GAMBLE H.R. & PATRASCU I.V. (1996). Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. *J. Food Prot.*, **59**, 1213–1217.
- GAMBLE H.R., RAPIC D., MARINCULIC A. & MURRELL K.D. (1988). Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, **30**, 131–137.
- GAMBLE H.R., POZIO E., BRUSCHI F., NÖCKLER K., KAPEL C.M.O. & GAJADHAR A.A. (2004). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the Use of Serological Tests for the Detection of *Trichinella* Infection in Animals and Man. *Parasite*, **11**, 3–13.
- GOMEZ-MORALES M.A., LUDOVISI A., AMATI M., BANDINO E., CAPELLI G., CORRIAS F., GELMINI L., NARDI A., SACCHI C., CHERCHI S., LALLE M. & POZIO E. (2014). Indirect versus direct detection methods of *Trichinella* spp. infection in wild boar (*Sus scrofa*). *Parasit. Vectors.*, **7**, 171.
- GÓMEZ-MORALES M.A., LUDOVISI A., AMATI M., BLAGA R., ZIVOJINOVIC M., RIBICICH M. & POZIO E. (2012). A distinctive Western blot pattern to recognize *Trichinella* infections in humans and pigs. *Int. J. Parasitol.*, **42**, 1017–1023.
- GÓMEZ-MORALES M.A., LUDOVISI A., AMATI M. & POZIO E. (2015). Candidates for reference swine serum with anti-*Trichinella* antibodies. *Vet. Parasitol.*, **208**, 218–224.
- GÓMEZ-MORALES M.A., SELMI M., LUDOVISI A., AMATI M., FIORENTINO E., BREVIGLIERI L., POGLAYEN G. & POZIO E. (2016). Hunting dogs as sentinel animals for monitoring infections with *Trichinella* spp. in wildlife. *Parasit. Vectors.*, **9**, 154.
- HILL D.E., FORBES L.B., KRAMER M., GAJADHAR A.A. & GAMBLE H.R. (2007). Larval viability and serological response in horses with long-term infection of *Trichinella spiralis*. *Vet. Parasit.*, **146**, 107–116.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, (2015). ISO 18743: Microbiology of the food chain - Detection of *Trichinella* larvae in meat by artificial digestion method. Genève, Switzerland.
- JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.
- KAPEL C.M.O. & GAMBLE H.R. (2000). Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int. J. Parasitol.*, **30**, 215–221.
- KORHONEN P.K., POZIO E., LA ROSA G., CHANG B.C., KOEHLER A.V., HOBERG E.P., BOAG P.R., TAN P., JEX A.R., HOFMANN A., STERNBERG P.W., YOUNG N.D. & GASSER R.B. (2016). Phylogenomic and biogeographic reconstruction of the *Trichinella* complex. *Nat. Commun.*, **7**, 10513.
- KRIVOKAPICH S.J., POZIO E., GATTI G.M., PROUS C.L., RIBICICH M., MARUCCI G., LA ROSA G. & CONFALONIERI V. (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int. J. Parasitol.*, **42**, 903–910.
- NOCKLER K., POZIO E., VOIGT W.P. & HEIDRICH J. (2000). Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet. Parasitol.*, **93**, 335–350.
- NOCKLER K., SERRANO F.J., BOIREAU P., KAPEL C.M. & POZIO E. (2005). Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.*, **132**, 85–90.
- ORTEGA-PIERRES M.G., YEPEZ-MULIA L., HOMAN W., GAMBLE H.R., LIM P., TAKAHASHI Y., WASSON D.L. & APPLETON J.A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: A platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.*, **18**, 273–284.
- POZIO E. (2014). Searching for *Trichinella*: not all pigs are created equal. *Trends Parasitol.*, **30**, 4–11.
- POZIO E. (2015). *Trichinella* spp. imported with live animals and meat. *Vet. Parasitol.*, **213**, 46–55.
- POZIO E. (2016a). *Trichinella pseudospiralis* an elusive nematode. *Vet. Parasitol.*, **231**, 97–101.
- POZIO E. (2016b). Adaptation of *Trichinella* spp. for survival in cold climates. *Food Waterborne Parasitol.*, **4**, 4–12.
- POZIO E. & LA ROSA G. (2003). PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. *Methods Mol. Biol.*, **216**, 299–309.

POZIO E., SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC L., GOMEZ MORALES M.A., BOIREAU P. & NÖCKLER K. (2002). Evaluation of ELISA and Western blot analyses using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Vet. Parasitol.*, **108**, 163–178.

POZIO E. & ZARLENGA D.S. (2013). New pieces of the *Trichinella* puzzle. *Int. J. Parasitol.*, **43** (12–13), 983–997.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Triquinelosis (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestres* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la Triquinelosis

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO TRIQUINELOSIS PORCINA:
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017